

DOI: 10.17117/na.2014.02.100

Поступило в редакцию: 08.12.2014

Дистанов В.Б., Фалалеева Т.В.
**Синтез и исследование производных нафталевой
кислоты в качестве флуоресцентных зондов**

Distanov V.B., Falaleeva T.V.
**Synthesis and investigation derivatives
naphthalic acid of fluorescent probes**

В данной статье представлены материалы по синтезу и исследованию некоторых водорастворимых производных нафталевой кислоты в качестве флуоресцентных зондов для определения патологических изменений крови на ранних стадиях беременности и при некоторых токсикозах. Проведены квантово-химические расчеты, спектрально-люминесцентные исследования и рассчитана возможная биологическая активность предлагаемых люминофоров для решения поставленной задачи

Ключевые слова: нафталевая кислота, флуоресцентные зонды, биологическая активность, ранняя диагностика заболеваний

Synthesis and investigations some water dissolved derivatives naphthalic acid as fluorescent probes for determine pathologic alteration blood on the early stages pregnancy and some toxic results is present in this paper. Quantum-chemistry calculation, spectral-luminescent investigation and possible biological activity present luminophores for decision supply problem is carry out

Key words: naphthalic acid, fluorescent probes, biological activity, early diagnostic ache

Дистанов Виталий Баламирович

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Национальный технический университет
«Харьковский политехнический институт»
г. Харьков, ул. Фрунзе, 21

Distanov Vitaliy Balamirovich

Candidate of Chemical Sciences, Senior Researcher
National technical university "Kharkov politechnical university"
Kharkov, Frunze str., 21

Фалалеева Татьяна Васильевна

Старший преподаватель

Национальный технический университет
«Харьковский политехнический институт»
г. Харьков, ул. Фрунзе, 21

Falaleeva Tatyana Vasilevna

Senior Lecturer

National technical university "Kharkov politechnical university"
Kharkov, Frunze str., 21

Из большого числа известных в настоящее время люминесцирующих органических веществ, сравнительно немногие находят практическое применение. Это в значительной мере связано с тем, что наряду с необходимыми оптическими характеристиками и другими свойствами, обуславливающими возможность использования люминофоров, они должны быть доступны в синтетическом отношении.

Одной из важных и перспективных групп люминофоров, получивших применение в различных областях науки и техники, являются производные нафталевой кислоты.

Эта дикарбоновая кислота и ее производные могут быть сравнительно легко получены из аценафтена, содержащегося в тяжелой фракции каменно-угольной смолы, из которой он легко выделяется в достаточно чистом виде.

Нафтаlevый ангидрид под действием УФ лучей слабо светится в углеводородных растворителях. Интенсивность свечения в большинстве случаев резко возрастает при введении в нафталиновое ядро электроно-донорных заместителей, сопряженных с ангидридной группировкой, обладающей сильными электроноакцепторными свойствами.

Однако для ряда применений замещенные нафтаlevого ангидрида как люминофоры обладают существенным недостатком, так как они чувствительны к действию щелочных реагентов. Поэтому, ангидриды используют, главным образом, при получении люминофоров более сложного строения или как люминофоры с активными группировками, вступающими в реакции с субстратом, на который они наносятся.

Органические люминофоры на основе производных 4-диалкиламинонафталевой кислоты нашли широкое применение в различных областях науки и техники. Они применяются как люминесцентные составляющие дневных флуоресцентных пигментов различного назначения [1-3], для окрашивания природных, искусственных и синтетических волокон и тканей [4-6], полимерных материалов [7, 8], в аналитической химии [9, 10], биологии и медицине в качестве флуоресцентных зондов [11, 12], в качестве активных сред лазеров на красителях [13], в нематических жидких кристаллах [14-15], в люминесцентной дефектоскопии металлических и неметаллических изделий [14, 15] и других областях науки и техники.

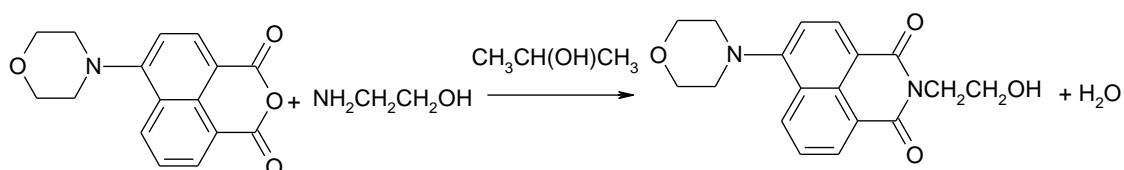
Введение в молекулу нафтаlevого ангидрида или его производных диалкиламиногруппы, в первую очередь остатков морфолина, пиперидина и некоторых других, позволяет существенно увеличить устойчивость к действию УФ-света [16-17]. Такие производные обладают интенсивной люминесценцией в желто-зеленой области спектра, высокой растворимостью в различных органических средах. Введение в молекулу нафталимидов активных группировок позволяет использовать их для структурного окрашивания ряда полимерных материалов [18].

Одним из перспективных направлений использования 4-замещенных нафталимидов является большая перспектива их применения в качестве флуоресцентных зондов для медико-биологических исследований.

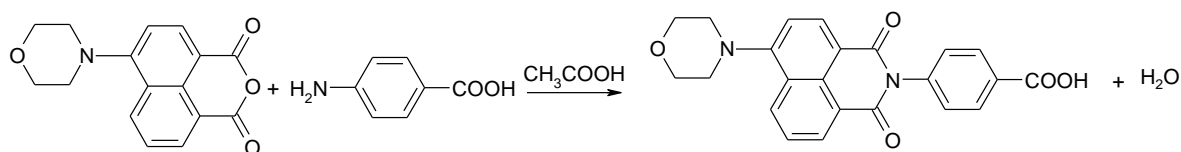
На протяжении многих лет некоторые производные нафталевой кислоты были использованы в этом качестве. Например, оксиоктилимид 4-диэтаноламинонафталевой кислоты был исследован в качестве флуоресцентного зонда для определения количества альбумина [10]. Некоторые производные 3-сульфо-4-морфолинафтаилоленбензимидазола оказались эффективными зондами для ранней диагностики патологических изменений крови человека при беременности разной тяжести и тиреотоксикозах [19].

Учитывая, что производные нафталевой кислоты по своим характеристикам полностью соответствуют возможности их использования для медико-биологических исследований, целью данной работы являлся синтез и изучение возможности использования некоторых водорастворимых 4-морфолинозамещенных 1,8-нафталиндикарбоновой кислоты. В качестве таких соединений нами были выбраны следующие вещества: N-(β-оксиэтиламино)-4-морфолинонафталимид, N-[п-(карбоксифенил)амино]-4-морфолинонафталимид, динатриевая соль 4-морфолинонафталевой кислоты. Эти производные были выбраны с целью уменьшения влияния заместителей в нафталиновом кольце на спектральные свойства продуктов взаимодействия с белком, а также на физико-химические характеристики модифицированных белковых материалов.

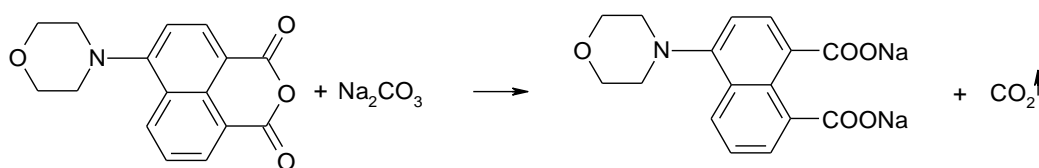
Синтез вышеуказанных люминофоров проводился по следующим схемам:



N-(β-оксиэтиламино)-4-морфолинонафталимид (соединение 1) получали при нагревании 4-морфолинонафталевого ангидрида с моноэтаноламином в уксусной кислоте и последующей очисткой конечного продукта.



N-[п-(карбоксифенил)амино]-4-морфолинонафталимид (соединение 2) получали аналогичным способом: 4-морфолинонафталевый ангидрид кипятили с п-аминобензойной кислотой в уксусной кислоте с последующей очисткой.



Динатриевая соль 4-морфолинонафталевой кислоты (соединение 3) была получена кипячением 4-морфолинонафталевого ангидрида в 10 процентном растворе карбоната натрия, после чего в охлажденный раствор был добавлен активированный уголь и при температуре кипения содового раствора на протяжении 20 минут реакционная масса выдерживалась. Затем, после охлаждения ее до комнатной температуры, раствор упаривался до начала выпадения кристаллов. После охлаждения, осадок отфильтровывался и сушился.

Для подтверждения правильности выбора органических люминофоров в качестве флуоресцентных зондов, были проведены расчеты возможной биологической активности синтезированных соединений, которые приведены в таблице. Прогнозирование возможной биологической активности синтезированных люминофоров проведено с использованием программного комплекса PASS C&T (Prediction of Activity Spectra for Substances: Complex & Training) [20].

Эта программа вмещает массив данных более 30000 биологически-активных соединений с известной биологической активностью и охватывает более 400 фармакологических эффектов, механизмов действия, а также мутагенность, канцерогенность, тератогенность и эмбриотоксичность. Средняя точность прогноза с помощью PASS C&T (текущий контроль с очередным исключением по одному соединению с исследуемой выборки) составляет около 84 %. Оценка биологической активности в PASS C&T имеет вид значений (да/нет). Результаты прогноза, которые представлены, кроме названия активности содержат оценку возможного наличия (P_a) какой-либо активности, которые имеют значения от 0 до 1.

Целью нашего исследования является поиск базовых структур для лекарственных средств, которые представляют собой элементы новизны и имеют необходимые показатели селективности, для которых $P_a > 0.5$.

Если рядом с основным действием возможного препарата проявляются побочные эффекты, то при отборе перспективных для дальнейших исследований соединений мы руководствовались комбинированным критерием:

- наличие в прогнозируемом спектре необходимых эффектов / механизмов;
- отсутствие нежелательных эффектов / механизмов

В данном случае возникает большое количество комбинаций, спрогнозированной программой PASS видов активностей с желательными или нежелательными эффектами. Для дальнейшего анализа нами была использована программа IBIAC, которая дает возможность установить взаимосвязь между фармакологическими эффектами и механизмом действия биологически активных веществ.

Программа PASS предоставляет большие возможности нахождения новых биологически активных соединений но при этом надо иметь ввиду, что система PASS не может дать однозначный ответ станет ли конкретное соединение лекарственным средством, поскольку это будет зависеть от многих других факторов (сравнительные оценки безопасности и клинической эффективности, наличия необходимых условий для разработки и т. д.).

Прогноз, однако, может помочь определить, какие тесты более адекватны для изучения биологической активности конкретного химического соединения, и какие из изучаемых соединений проявляют необходимые эффекты.

Основываясь на исследовании полученных нами соединений, с использованием программы PASS, нами были получены следующие результаты о возможной биологической активности отобранных соединений, которые приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, наиболее перспективными являются вещества 1 и 2, которые, вероятнее всего, имеют возможность более эффективно связываться с молекулой белка.

Для того чтобы более качественно подойти к исследованиям медико-биологических свойств исследуемых флуоресцентных зондов, необходимо было провести квантово-химические расчеты и изучить сольвато-флуорохромные свойства этих соединений, а также определить влияние гео-

метрической структуры люминофора на возможность взаимодействия с макромолекулой белка и определить наиболее эффективное взаимодействие с молекулой зонда. Во-вторых, необходимо определить полярность соединений, дипольный момент, чувствительность к полярности среды, а также возможность образования водородных связей.

Таблица 1. Прогнозируемая медико-биологическая активность синтезированных соединений

Активность	Возможность наличия активности, %		
	Соединение 1	Соединение 2	Соединение 3
Антагонист рецепторов анафилатоксина	84,9	65,5	-
Гипергликемический	65,9	57,3	-
Рибулозо-3-фосфат эпимеразного ингибитора	62,2	75,9	52,4
Ксеростомия	61,4	53,1	-
Инсулиновый ингибитор	54,0	71,6	-
Противосудорожный	52,6	53,5	-
Антагонист тромбоксана В2	50,6	60,6	-
Ларингоспазм	48,0	58,5	-
Противоэземного действия	-	73,4	-
Ингибитор проникновения мембран	53,8	59,6	-
Лечение фобичных нарушений	-	69,1	-
Ацидоз	-	61,1	-
Нервозность	50,8	-	-
Ноотропная	53,7	-	-
Противоневритическая	82,1	-	-
Радиосенсибилизирующее вещество	63,0	-	-

Такие расчеты дают возможность определить насколько предложенные соединения будут эффективными при взаимодействии с белком.

Во-первых, геометрическое и пространственное строение соединений моделировалось всевалентным полуэмпирическим методом AM1, а также методом молекулярной механики с поправкой на эффекты сопряжения в рамках π -электронного приближения VESCF в силовом поле MMX-M, реализованного в пакете PCModel показана на рисунках 1, 2.

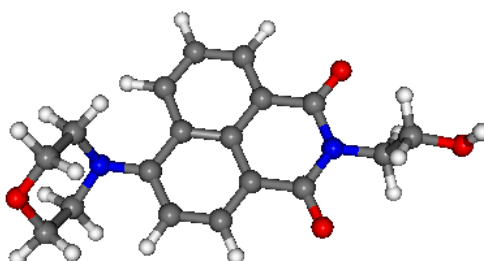
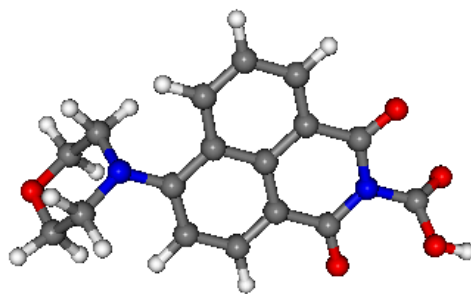


Рис. 1. Геометрическое строение N-(6-оксиэтил)-4-морфолинонафталимида



**Рис. 2. Геометрическое строение
N-(*p*-карбоксифенил)-4-морфолинонафталимида**

Во-вторых, необходимо было определить полярность соединений, дипольный момент, чувствительность к полярности среды, геометрические размеры молекул и их заряд, а также способность к образованию водородных связей. Эти данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Квантово-химические расчеты синтезированных соединений

	потенциал ионизации, эВ	заряд	дипольный момент, Д	изменение дипольного момента при возбуждении, Д	молекулярные размеры, Å*				макс. количество ММ водородных связей связей***
					a	b	c	средне-геометрич. диаметр**	
I	8.98	0	5.34	4.06	13.07	7.23	5.13	7.86	5
II	9.12	0	7.03	4.64	11.75	7.47	4.33	7.24	6

* молекулярные размеры (*molecular dimensions*) рассчитаны с учетом Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов

** средне-геометрический диаметр определяли как корень кубический умножения молекулярных размеров – $r = \sqrt[3]{a \times b \times c}$

*** количество водородных связей, которые получили в результате следующих расчетов: один карбонильный (в том числе карбоксильной группы) или эфирный кислород – одна водородная связь

На основе проведенных квантово-химических расчетов, можно сделать следующие выводы:

– дипольный момент соединений 1 и 2 при возбуждении возрастает в 1.76 и 1.66 раза, соответственно

– рассмотренные соединения должны быть чувствительными к полярности среды. Однако более достоверная информация может быть получена только после сольватофлуорохромных исследований.

Учитывая эти выводы, нами были проведены такие исследования, другими словами мы определили зависимость флуоресцентных характеристик синтезированных соединений от полярности растворителя, который используется. Данные спектры приведены на рисунках 3 и 4.

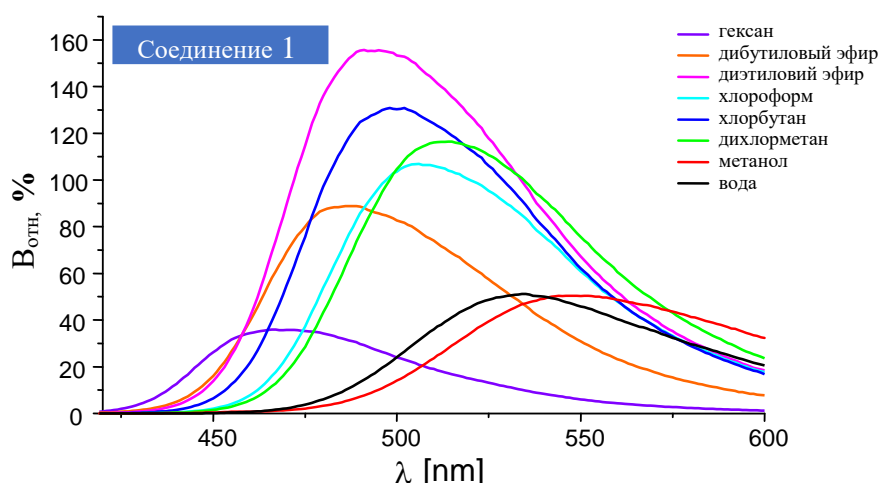


Рис. 3. Зависимость флуоресцентных характеристик *N*-(6-оксиэтил)-4-морфолинонафталимида от природы растворителя

Как видно из спектров люминесценции, которые измерялись в растворителях различной полярности, максимум люминесценции и относительная интенсивность свечения синтезированных соединений существенно изменяются в зависимости от природы растворителя.

Одним из таких растворителей является вода. Небольшая интенсивность люминесценции синтезированных соединений обусловлена тем, что вода является очень полярной, а полярные растворители в своем большинстве приводят к падению интенсивности.

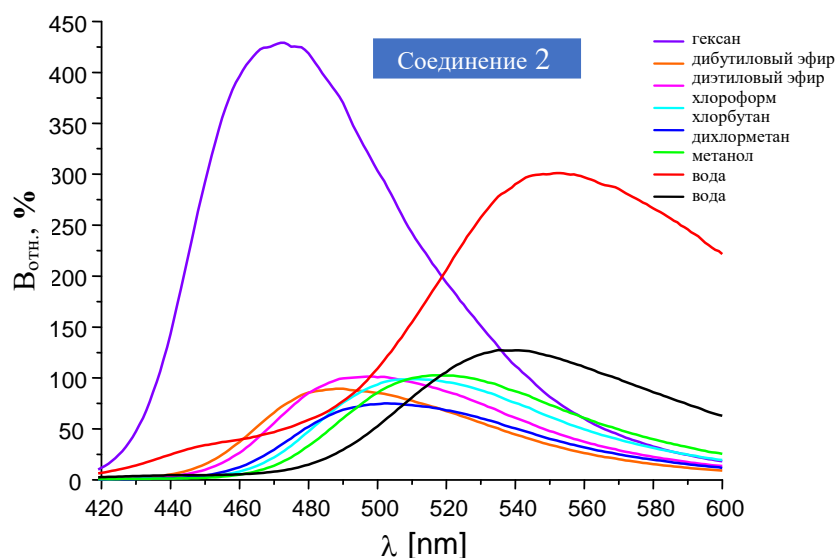


Рис. 4. Зависимость флуоресцентных характеристик *N*-(*p*-карбоксифенил)-4-морфолинонафталимида от природы растворителя

Исходя из поставленной задачи, в нашем случае она больше всего подходит для ее использования в медико-биологических исследовании. Кроме того сывороточный альбумин быка (САБ) используется в виде водного раствора.

Как известно, интенсивность флуоресценции какого-либо органического люминофора зависит от его концентрации в среде, в какой проводились изме-

рения. В связи с этим нами были проведены исследования зависимости интенсивности излучения от концентрации САБ, результаты которых приведены на рисунке 5. В данном случае увеличение концентрации САБ приводит к увеличению концентрации флуоресцентного зонда в растворе. Но, есть такое понятие, как концентрационное тушение люминесценции, другими словами, при повышенной концентрации люминофора за счет образования каких-либо конгломератов интенсивность излучения падает.

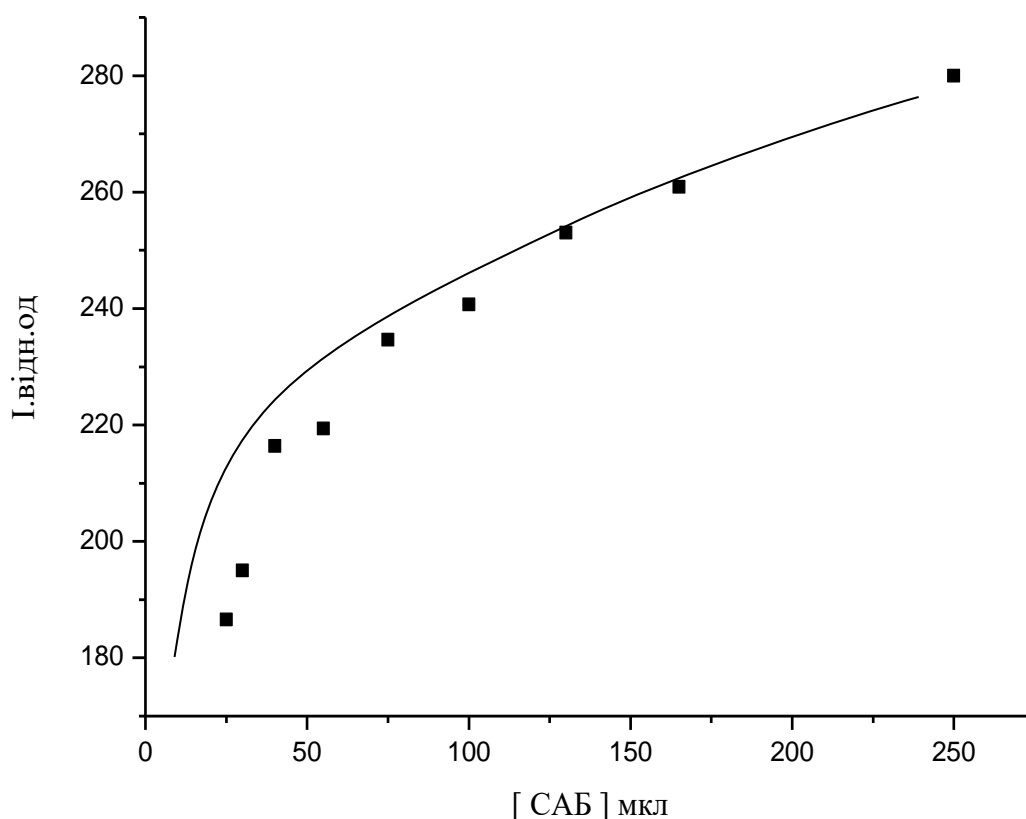


Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации САБ

На данном графике мы привели только те значения, которые позволяют нам определить оптимальную концентрацию люминофора в растворе, который исследуется. Это не более 250 мкл САБ в растворе. Затем интенсивность люминесценции резко понижается.

Таким образом, мы пришли до определения оптимальной концентрации органического люминофора в исследуемых растворах.

Растворимость в воде и возможность образования химических связей между гидроксильными и карбонильными группами с аминок группами или карбоксильными белка дает возможность использования этих соединений в качестве флуоресцентных зондов в медико-биологических исследованиях. Кроме того, интенсивность флуоресценции этих соединений существенно изменяется при переходе из водного раствора в белковую молекулу и всегда сопровождается сдвигом максимума люминесценции, что дает возможность отдельно следить за спектральными изменениями свободного и связанного с

белком зонда. Еще одним из преимуществ использования флуоресцентных зондов является то, что при их использовании для исследований биообъектов спектры возбуждения и флуоресценции меньше перекрываются со спектрами существующих хромофоров биомакромолекул (ароматических остатков белков и других хромофорных групп).

Проведенные исследования по изменению спектральных характеристик с использованием синтезированных люминофоров на водных растворах альбумина – белка, который часто используется в качестве тестового при оценке потенциальных возможностей нового флуоресцентного красителя, показали, что данные вещества чувствительны к незначительным конформационным изменениям белка, которые вызваны наименее разрушительным «быстрым» охлаждением до температуры жидкого азота (-196 °C).

При этом в зависимости от конкретной химической структуры боковых радикалов, наблюдается разная реакция красителей на конформационные изменения белка, что может быть связано с различными механизмами их взаимодействия с макромолекулой белка и, таким образом, позволяет исследовать всевозможные части белковой молекулы.

Синтезированные соединения оказались также чувствительными к конформационному состоянию патологически измененных белков плазмы крови больных, которые страдают токсикозами беременности различной тяжести и тиреотоксикозом.

Этот подход может быть использован при разработке экспресс-методов диагностики и мониторинга этих заболеваний.

Список литературы:

1. Красовицкий Б.М., Шевченко Э.А., Дистанов В.Б. и др. А. с. 1054367 СССР. МКИ С 08 G 63/68; С 09 К 9/02. Способ получения флуоресцентных окрашенных полиэфиров / Заявл. 12.03/82. Оpubл. 15/11/83, Бюл. № 42. С. 6.
2. Переяслова Д.Г., Таций Г.В., Шевченко Э.А., Дистанов В.Б. и др. А. с. 1174448 СССР. МКИ С 09 В 57/12; С 09 К 11/02. Способ получения дневных флуоресцентных пигментов / Заявл. 26.12.83; Оpubл. 23.08.85, Бюл. № 31. С. 4.
3. Дистанов В.Б., Сальвицкая Л.Н., Чумак Т.В., Шевченко Э.А. и др. А. с. 1484826 СССР. МКИ С 09 К 11/06; D 06 P 3/79. Композиция для получения флуоресцентного пигмента / Заявл. 20.11.86; Оpubл. 07.06.89, Бюл. № 21 – С. 3.
4. Дистанов В.Б., Тульгук З.Д., Уханкина Л.В. и др. Пат. 2017878 РФ. МКИ 5 D 06 P 3/42. Способ получения флуоресцентного окрашенного волокна / Заявл. 02.07.91; Оpubл. 30.07.94, Бюл. № 14. С. 97.
5. Дистанов В.Б., Тульгук З.Д., Уханкина Л.В. и др. Пат. 2010900 РФ. МКИ 5 D 06 P 3/42; D 06 P 3/48. Способ получения флуоресцентного окрашенного волокна / Заявл. 26.06.91; Оpubл. 15.04.94, Бюл. № 7. С. 86
6. Дистанов В.Б., Тульгук З.Д., Уханкина Л.В. и др. Пат. 2010901 РФ. МКИ 5 D 06 P 3/42; D 06 P 3/48. Способ получения флуоресцентного окрашенного волокна / Заявл. 08.07.91; Оpubл. 15.04.94, Бюл. № 7. С. 86
7. Сальвицкая Л.Н., Маслий Е.В., Красовицкий Б.М. и др. А. с. 1521743 СССР. МКИ С 08 J 3/2; С 08 L 25/06. Окрашенная поли-стирольная композиция / Заявл. 20.01.87; Оpubл. 15.11.89, Бюл. № 42. С. 3.
8. Шевченко Э.А., Дистанов В.Б., Бланк А.Б. А. с. 1047838 СССР. МКИ С 01 G 5/00. Способ определения серебра в растворах / Заявл. 19.04.82; Оpubл. 15.10.83, Бюл. № 38. С. 5.
9. Шевченко Э.А., Дистанов В.Б., Бланк А.Б. Люминесцентно-титриметрическое определение серебра с солями 4-диалкиламинонафталевых кислот // Заводская лаборатория. 1984. Т. 50. №6. С. 5-6.
10. Айдыралиев Р.К., Добрецов Г.Е., Лапшин Е.Н. и др. Взаимодействие флуоресцентных зондов с плазмой крови // Биофизика. 1988. Т. 33. №2. С. 378.

11. Дістанов В.Б., Берданова В.Ф., Шаповалов В.А., Назарова О.С. Синтез та дослідження похідних карбонових кислот – потенційних біологічно активних речовин. 1. Синтез похідних 4-морфолінонафталіміду // Вісник фармації. 1999. № 1 (19). С. 17-20.
12. Денисов Л.К., Цогоева С.А., Мельникова Л.М. и др. А. с. 1106398 СССР. МКИ Н 01 S 3/20. Активная среда для лазеров на растворах органических соединений / Заявл. 11.06.82; Оpubл. 1.04.84. Бюл. № 28. С. 4.
13. Аболин А.Г., Болотин Б.М., Дистанов В.Б. и др. А. с. 1419113 СССР. МКИ C07D 221/14, C09K 19/60. Производные нафталин-1,8-дикарбоновой кислоты в качестве люминесцентных дихроичных красителей для нематического жидкокристаллического материала и нематический жидкокристаллический материал для электрооптических устройств / Заявл. 09.10.86; Оpubл. 22.04.88, Бюл. № 31. С. 16
14. Луговский А.П., Рачкевич В.С., Эрдман М.И. Синтез 4-алкиламинонаф-талимидов и изучение их люминесцентных и ориентационных свойств в жидкокристаллической матрице // Журнал органической химии. 1988. Т. XXIV. Вып. 3. С. 625-628.
15. Малкес Л.Я., Сукиасова Л.И., Шевченко Э.А., Дистанов В.Б. и др. А. с. 1221891 СССР. МКИ C 09 11/06, G 01 N 21/91. Пенетрант для люми-несцентной дефектоскопии металли-ческих изделий / Заявл. 16.08.84; Оpubл. 01.12.85, Бюл. № 2. С. 4.
16. Малкес Л.Я., Шевченко Э.А., Дистанов В.Б. и др. А. с. 1384000 СССР. МКИ G 01 N 21/91. Пенетрант для люминесцентной дефектоскопии / Заявл. 11.08.86; Оpubл. 22.11.87, Бюл. № 11. С.4.
17. Peters A.T., Bide M.J. Ammo Derivatives of 1,8-naphthalic Anhydrid and Derived Dyes for Synthetic-Polymer Fibres // Dyes and Pigments. 1985. № 6. P. 349-375.
18. Дистанов В.Б., Берданова В.Ф., Гуркаленко Ю.А., Задриборода Е.В. Ис-следование влияния концентрации органических люминофоров на лю-минесцентные свойства ацетатных, триацетатных и поликапроамидных волокон при их получении // Междун. конф. MicroCAD'98 "Информационные технологии: наука, техника, технология, образование, здоровье". Харьков. 1998. Вып. 6. Ч. 3. С. 280-284.
19. Э.А. Ромоданова, В.А. Гаврик, А.Д. Рошаль, В.Б. Дистанов и др. Изменение конформации САЧ под влиянием замораживания и лазерного излучения по данным флуоресценции производного нафталевой кислоты // Проблемы криобиологии. 2000. № 3. С. 28-32.
20. Дистанов В.Б., Фалалеева Т.В. Синтез и исследование производных 4-морфолінонафталевої кислоты в качестве флуоресцентных зондов для определения качества крови // Сб. научн. Трудов по матеріалам науково-практичної конференції «Наука и образование в XXI веке». Тамбов. 2014. Ч. 15. С. 52-53.
21. Фалалеева Т.В., Дистанов В.Б. Синтез и компьютерное прогнозирование биологической активности некоторых производных 4-морфолінонафталевої кислоты // Сб. научн. Трудов по матеріалам науково-практичної конференції «Теоретические и прикладные вопросы науки и образования». Тамбов. 2015. Ч. 14. С. 135-138.
22. В.Б. Дістанов, О.М. Гаврилiна, А.Д. Рошаль та iн. Синтез та дослідження деяких похідних 4-морфолінонафталевої кислоти // Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хiмiї: Матеріали Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених. Ніжин. 2014. С. 49-53.

© 2014, Дистанов В.Б., Фалалеева Т.В.
Синтез и исследование производных нафталевой
кислоты в качестве флуоресцентных зондов

© 2014, Distanov V.B., Falaleeva T.V.
Synthesis and investigation derivatives naphthalic
acid of fluorescent probes